

B79

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true
copy of the following application as filed with this
Office.

DATE OF APPLICATION: March 31, 1988

PATENT APPLICATION NO. 63-80829

APPLICANT: MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL
CO., LTD.

Dated this day of , 198 .

Fumitake YOSHIDA
Director-General
PATENT OFFICE

Certificate No. HEI

APPLICATION FOR PATENT

March 31, 1988

The Director-General
The Patent Office

1. Title of the Invention: BIOSENSOR
 2. Number of Claims for a Patent: 3
 3. Inventors: Name: Shiro NANKAI
Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.,
1006, Oaza Kadoma,
Kadoma-shi, Osaka, Japan.
(and three others)
 4. Applicant: Name: (582) MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.
Address: 1006, Oaza Kadoma,
Kadoma-shi, Osaka, Japan.
Akio TANII,
Representative Director
 5. Agents: Name: (5971) Toshio NAKAO,
Patent Attorney
Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
INDUSTRIAL CO., LTD.,
1006, Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
Osaka 571, Japan.
(and another)
- Communication Address: Tokyo Detached Office
of the Legal Section
Telephone (Tokyo) 437-1121
6. List of the annexed documents:
 - (1) Specification ----- 1 copy
 - (2) Drawings ----- 1 copy
 - (3) Power of Attorney ----- 1 copy
 - (4) Duplicate of Application Form ----- 1 copy

7. Inventors and Agent other than those mentioned above:

(1) Inventors: Name: Mariko KAWAGURI
 Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
 INDUSTRIAL CO., LTD., 1006,
 Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
 Osaka, Japan.

Name: Mayumi FUJITA
 Address: - do. -

Name: Takashi IIJIMA
 Address: - do. -

(2) Agent: Name: (6152) Shigetaka AWANO,
 Patent Attorney
 Address: c/o MATSUSHITA ELECTRIC
 INDUSTRIAL CO., LTD., 1006,
 Oaza Kadoma, Kadoma-shi,
 Osaka, Japan.

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

BIOSENSOR

2. Scope of Claim for a Patent

(1) A biosensor comprising an insulating base plate having provided thereon an electrode system comprising at least an electrode for measurement and a counter electrode mainly composed of carbon, characterized in that an enzyme reaction layer composed of a hydrophilic high molecular substance and an oxidoreductase is provided on said electrode system.

(2) A biosensor comprising an insulating base plate having provided thereon two pairs of electrode systems comprising at least an electrode for measurement and a counter electrode mainly composed of carbon, characterized in that an enzyme reaction layer composed of a hydrophilic high molecular substance and an oxidoreductase is provided on one electrode system and a hydrophilic high molecular substance layer or a layer composed of a hydrophilic high molecular substance and inactivated oxidoreductase is provided on another electrode system.

(3) A biosensor as claimed in claim 1 or 2, wherein said electrode system comprises an electrode for measurement and a counter electrode mainly composed of carbon and a reference electrode comprising a silver/silver chloride reference electrode.

3. Detailed Explanation of the Invention

Field of the Invention

The present invention relates to biosensors which can quantitatively determine a specific component in a trace amount of various sample solutions from the living body in a rapid and easy way with high accuracy.

Prior Art

As a system for readily performing quantitative determination of a specific component in a sample solution such as blood or the like from living bodies without requiring dilution, stirring, etc. of the sample solution, a biosensor described in Japanese Patent Application Laid-Open No. 61-294351 has been heretofore proposed (Fig. 5). In this biosensor, the electrode systems 8 (8'), 9 (9') and 10 (10') composed of carbon, etc. are formed on an insulating base plate 1 by means of screen printing, etc.; the electrode systems are covered with a porous material 12 having carried thereon an oxidoreductase and an electron acceptor and the whole is integrated with a holding frame 11 and a cover 3. When a sample solution is dropped onto the porous material, the oxidoreductase and the electron acceptor are dissolved in the sample solution, whereby an enzyme reaction proceeds with a substrate in the sample solution and the electron acceptor is reduced. After completion of the reaction, the reduced electron acceptor is electrochemically oxidized and a substrate concentration in the sample is

determined from a current level for the oxidation obtained in this case.

Problem to be solved by the Invention

In the foregoing conventional construction, the base surface including the electrode system is not always uniformly wetted so that air bubbles remain between the porous material and the base plate, whereby a response current is affected or its reaction rate is reduced in some occasion. Further when a substance that is readily adsorbed to electrodes or an electrode-active substance is present in a sample solution, response of the sensor is affected by such a substance.

Means for solving the Problem

In order to solve the foregoing problem, the present invention is directed to a biosensor comprising an insulating base plate having provided thereon an electrode system comprising at least an electrode for measurement and a counter electrode mainly composed of carbon, characterized in that an enzyme reaction layer composed of a hydrophilic high molecular substance and an oxidoreductase is provided on the electrode system.

The present invention is further directed to a biosensor comprising an insulating base plate having provided thereon two pairs of electrode systems comprising at least an electrode for measurement and a counter electrode mainly composed of carbon, characterized in that an enzyme reaction layer composed

of a hydrophilic high molecular substance and an oxidoreductase is provided on one electrode system and a hydrophilic high molecular substance layer or a layer composed of a hydrophilic high molecular substance and inactivated oxidoreductase is provided on another electrode system.

Function

According to the present invention, a disposable type biosensor which can determine a substrate concentration in an extremely simple way with good accuracy and has excellent preservation property can be constructed.

Examples

Hereafter the present invention is described by referring to the examples.

(Example 1)

As one embodiment of the biosensor, a glucose sensor is explained.

Fig. 1 shows a cross-sectional view of a glucose sensor prepared as one embodiment of the biosensor in accordance with the present invention. Fig. 2 shows a perspective view of the electrode portion used for preparing the sensor.

Conductive silver paste is printed on an insulating base plate 1 composed of polyethylene terephthalate by means of screen printing to form leads

2, 3 (3'). Next, conductive carbon paste containing a resin binder is printed. By drying with heating, the electrode system comprised of an electrode for measurement 4 and a counter electrode 5 is formed. Furthermore, insulating paste is printed so as to partly cover the electrode system thereby to make the exposed area of the electrodes definite and cover unnecessary part of the leads. By a heat treatment, an insulating layer 6 is formed.

A glucose standard solution, 10 μ l, is dropped as a sample solution onto the CMC-GOD layer of the glucose sensor constructed as described above. By applying a pulse voltage of 1 V between the electrodes, the electrode for measurement is polarized into the anode direction 1 minute after application of the voltage.

The added sample solution dissolves the enzyme and CMC therein and quickly spreads onto the electrode surface while it is converted into a viscous liquid; no bubble remains in this case. This is believed to be because wettability on the electrode surface would be improved by the hydrophilic high molecular substance perviously formed on the electrode.

On the other hand, glucose in the added sample solution reacts with the enzyme by the action of glucose oxidase carried on the electrodes to produce hydrogen peroxide. Therefore, by applying the voltage into the anode direction described above, an oxidizing current for

the produced hydrogen peroxide is obtained. This current level corresponds to the concentration of glucose which is a substrate.

Fig. 3 shows relationship between the current level 5 seconds after application of voltage and a glucose concentration, indicating that an extremely good response characteristic was obtained.

(Example 2)

Two pairs of the same electrode parts as shown in Fig. 2 were formed onto one insulating base plate composed of polyethylene terephthalate in close contact by screen printing in a manner similar to Example 1. Next, CMC layer was formed onto the two pairs of the electrode systems in a manner similar to Example 1. Thereafter, GOD-CMC layer was formed only on the CMC layer of one electrode system as described above.

With respect to the glucose sensor having two pairs of the electrode systems obtained as described above, a glucose standard solution (200 mg/dl) containing ascorbic acid having various concentrations was dropped onto each of the electrode systems. As in Example 1, a voltage of 1 V was applied about 1 minute after the dropping and a current level was measured 5 seconds after. The results are shown in Fig. 4. The output of the electrode system of CMC-GOD layer is shown by A and the output (blank output) of the electrode system of CMC layer alone is shown by B. As is evident from the

drawing, the output of A increases as the concentration of ascorbic acid increases and on the other hand, a similar increase is noted also with the output of B. This indicates that the sensitivities of the respective electrode systems to ascorbic acid are almost equal to each other. When a difference in output between the both electrode systems (A - B) is detected therefrom, a current level based on glucose can be obtained. That is, by using two pairs of the electrode systems, an error due to substances sensitive to electrode can be greatly reduced. Such an effect was also noted with uric acid, etc., in addition to ascorbic acid.

As such, by constructing the sensor by providing two pairs of the electrode systems and forming a hydrophilic high molecular substance-enzyme layer on one electrode system and a hydrophilic high molecular substance layer alone on another electrode system, a substrate concentration in the sample solution containing interferants can be measured with good accuracy.

In the above, after the CMC-GOD layer is formed on both electrode systems, local heating by laser or irradiation with ultraviolet rays, etc. may also be applied only to either electrode system, whereby GOD is inactivated to prepare the electrode system for blank outputting. By doing so, the constructions are identical in the two electrode systems except for enzyme activity so that output currents due to interferants in the two

electrode systems can be conformable much better with each other, resulting in an improved accuracy in detection with the sensor.

In the foregoing embodiment, the electrode system wherein the electrode portion comprises two electrodes of the electrode for measurement and the counter electrode has been described. By constructing the electrode system by three electrodes further involving silver/silver chloride, the accuracy can further be improved. One embodiment for constructing the electrode system comprises printing 3 silver leads onto a base plate, then printing carbon paste only on the tip portions of two leads to coat an insulating layer, treating the surface of the tip portion of the remaining lead in which silver is exposed to form silver chloride into a silver/silver chloride electrode. Thus, the electrode system could be constructed in such a manner.

As the hydrophilic high molecular substance, gelatin, methyl cellulose and the like can be used, in addition to CMC, and hydrophilic high molecular substances of starch type, carboxymethyl cellulose type, gelatin type, acrylate type, vinyl alcohol type, vinylpyrrolidone type and maleic anhydride type are preferred. These hydrophilic high molecular substances can be readily rendered aqueous solutions. Therefore, by applying the aqueous solution in a suitable concentration and drying, a thin layer having a necessary layer

thickness can be formed on the electrode.

As the oxidoreductase, glucose oxidase is used in the examples but other enzymes such as alcohol oxidase, cholesterol oxidase, etc. can also be used.

Effects of the Invention

As stated above, the biosensor of the present invention can provide highly reliable response by forming the enzyme reaction layer composed of the hydrophilic high molecular substance and the oxidoreductase on the electrode system, and further by providing two pairs of electrode systems wherein the enzyme reaction layer composed of the hydrophilic high molecular substance and the oxidoreductase is provided on one electrode system and the hydrophilic high molecular substance layer or the layer composed of hydrophilic high molecular substance and inactivated oxidoreductase is formed on another electrode system. In addition, it is unnecessary to carry any electron acceptor so that the biosensor having excellent preservation property can be provided at low costs.

4. Brief Explanation of Drawings

Fig. 1 shows a cross-sectional view of the biosensor which is one embodiment of the present invention. Fig. 2 shows a perspective view of the electrode portion. Figs. 3 and 4 are response characteristics of the biosensor. Fig. 5 shows a perspective view of a conventional biosensor

disassembled.

1 insulating base plate
2, 3, 3' lead
4, 9, 9' electrode for measurement
5, 5', 8, 8' counter electrode
6 insulating layer
7 CMC-GOD layer
10, 10' reference electrode
11 holding frame
12 porous material
13 cover

Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney,
and another

Fig. 1

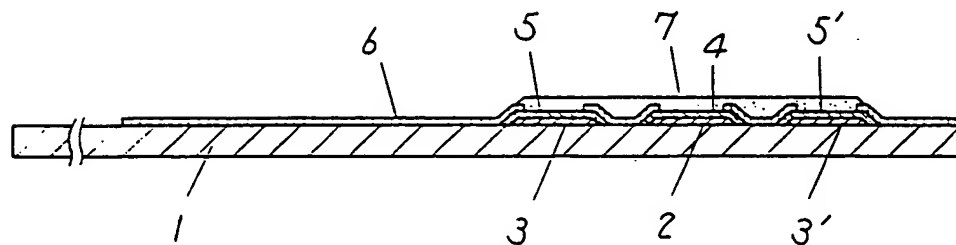
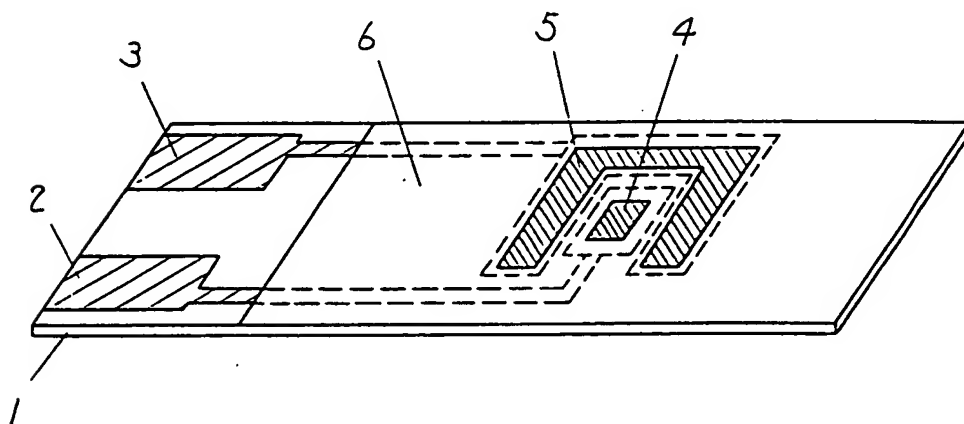


Fig. 2



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 3

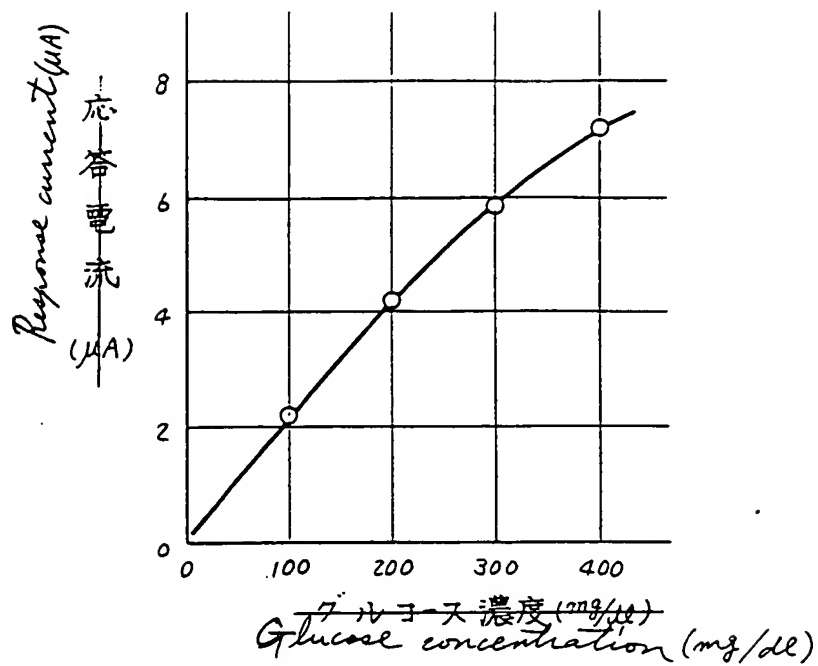
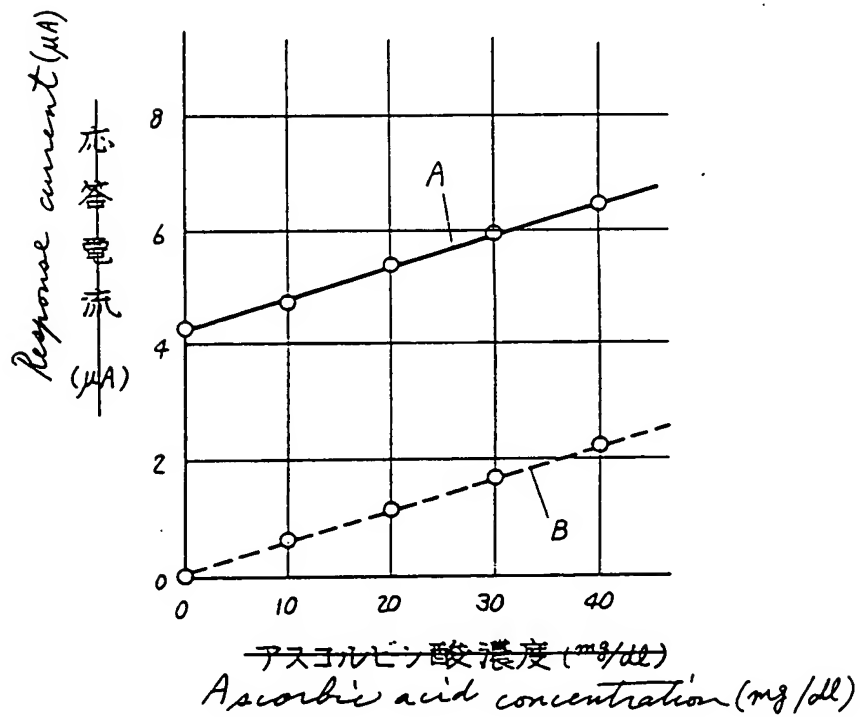
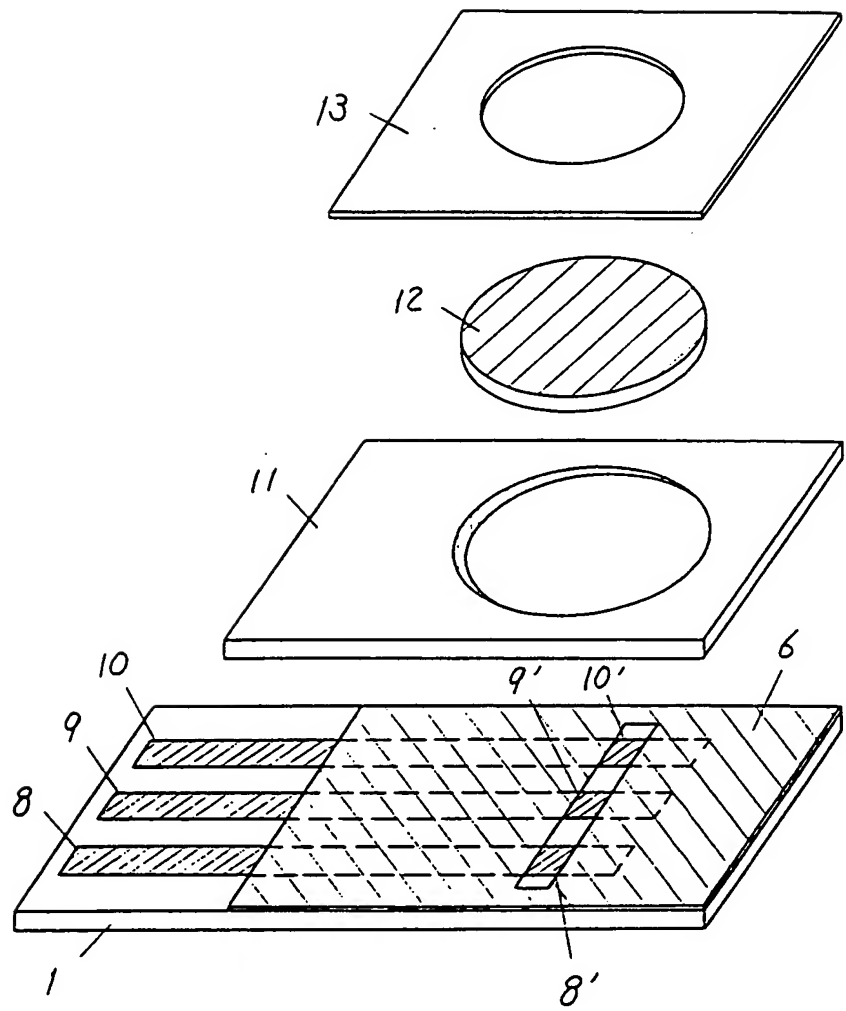


Fig. 4



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

Fig. 5



Agents: Toshio NAKAO, Patent Attorney, and another

⑫ 公開特許公報(A) 平1-253648

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成1年(1989)10月9日

G 01 N 27/30

3 5 3

J-7363-2G

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑥ 発明の名称 バイオセンサ

⑪ 特 願 昭63-80829

⑫ 出 願 昭63(1988)3月31日

⑬ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑭ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑮ 発 明 者	藤 田 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑯ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑰ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
⑱ 代 理 人	弁理士 中尾 敏 男	外 1 名	

明 細 書

1. 発明の名称

バイオセンサ

2. 特許請求の範囲

(1) 絶縁性の基板上に、カーボンを主体とする少くとも測定極と対極からなる電極系を設け、前記電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備えたことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 絶縁性の基板上に、カーボンを主体とする少くとも測定極と対極からなる2組の電極系を設け、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備え、他方の電極系上に親水性高分子層あるいは親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層を備えたことを特徴とするバイオセンサ。

(3) 電極系が、カーボンを主体とする測定極と対極および銀/塩化銀参照極からなる参照極であることを特徴とする請求項1または2に記載のバイオセンサ。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なう事なく簡易に定量しうる方式として、特開昭61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した(第5図)。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系8(8'), 9(9'), 10(10')を形成し、この上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体12で覆い保持枠11とカバー13で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多孔体に担持されている酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受

容を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする課題

この様な従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り、応答電流に影響を与えたり反応速度が低下する場合があった。また、試料液中に、電極に吸着しやすい物質や電極活性な物質が存在するとセンサの応答に影響がみうけられた。

課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するため、絶縁性の基板上にカーボンを主体とする少くとも測定極と対極からなる電極系を設け、電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備えたものである。

さらには、絶縁性の基板上に、カーボンを主体とする少くとも測定極と対極からなる2組の電極系を設け、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を備え、他方の電極

系上に親水性高分子層あるいは親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層を備えたものである。

作用

本発明によれば、極めて容易に精度よく基質濃度を測定することができ、かつ、保存性に優れたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができる。

実施例

以下、本発明を実施例により説明する。

(実施例1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。

第1図は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサの断面図であり、第2図はセンサ作製に用いた電極部分を斜視図で示したものである。

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3(3')を形成する。次に、樹

-3-

脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極4、対極5からなる電極系を形成する。さらに、電極系を部分的に覆い、電極の露出部分の面積を一定とし、かつリードの不要部を覆うように絶縁性ペーストを印刷し、加熱処理をして絶縁層6を形成する。

次に、4、5(5')の露出部分を研磨後、空气中で100℃にて4時間熱処理を施した。このようにして電極部分を構成した後、親水性高分子として、カルボキシメチルセルロース(以下CMCと略す)の0.5wt%水溶液を電極上へ展開、乾燥しCMC層を形成する。次に、このCMC層を覆うように、酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD)をリン酸緩衝液に溶解したものを展開し、乾燥させ、CMC-GOD層7を形成した。この場合、CMCとGODは部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。

上記のように構成したグルコースセンサのCMC-GOD層の上へ試料液としてグルコース標準液を10μl滴下し、滴下1分後に電極間に1V

-4-

のバース電圧を印加することにより、測定極をアノード方向へ分極した。

添加された試料液は酵素、CMCを溶解し粘質な液体となりながら電極面上を速やかに拡がり、気泡の残留は認められなかった。これは、電極上に予め形成された親水性高分子層により電極面の濡れが向上したことによるものと考えられる。

一方、添加された試料液中のグルコースは電極上に担持されたグルコースオキシダーゼの作用で酵素と反応して過酸化水素を生成する。そこで、上記のアノード方向への電圧印加により、生成した過酸化水素の酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。

第3図は、上記構成になるセンサの応答特性の一例として、電圧印加5秒後の電流値とグルコース濃度との関係を示すものであり、極めて良好な応答性が得られた。

(実施例2)

実施例1と同様にしてスクリーン印刷により、第2図に示した電極部分と同じもの2組をポリエ

-5-

-326-

-6-

チレンテレフタレートからなる1枚の絶縁性の基板上に近接して形成した。次に、2組の電極系の上に実施例1と同様にCMC層を形成した後、一方の電極系のCMC層の上だけに鉛記同様にCOD-CMC層を形成した。

上記の様にして得られた2組の電極系を有するグルコースセンサについて、各々の電極系の上へ種々の濃度のアスコルビン酸を含むグルコース標準液(200mg/dl)を滴下し、実施例1と同様に、1分後に1Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。結果を第4図に示す。CMC-COD層の電極系の出力をAで、また、CMC層だけの電極系の出力(ブランク出力)をBでそれぞれ示す。図より明らかなように、Aの出力はアスコルビン酸の濃度増加とともに増大し、一方Bの出力も同様な増加がみられる。これはアスコルビン酸に対する各々の電極系の感度がほぼ等しいことを示している。これより、両電極系の出力の差(A-B)を検出するとグルコースに基く電流値が得られる。すなわち、2組の電極系を用い

ることにより電極活性な物質による誤差を大幅に低減することができる。この様な効果はアスコルビン酸以外にも、尿酸などについても認められた。

この様に、2組の電極系を設け、一方の電極系に親水性高分子-酵素層、他方の電極系に親水性高分子層だけを形成して、センサを構成することにより、妨害物質を含む試料液中の基質濃度を精度よく測定することができる。

上記において、両方の電極系にCMC-COD層を形成した後、一方の電極系についてのみレーザ照射による局部加熱、紫外線照射などを施すことによりCODを失活させて、ブランク出力用の電極系としても良い。こうすると酵素活性以外は両電極系の構成が同一となり、両電極系の妨害物質による出力電流をさらによく一致させることができ、センサ検出精度を向上することができる。

また、以上の実施例においては電極部分が測定極と対極の2電極からなる電極系について述べたが、電極系を銀/塩化銀を加えた3電極から構成することにより、さらに精度を向上することがで

-7-

きる。電極系を構成する方法の一例としては、3本のリードを基板上に印刷した後、2本のリード先端部の上だけにカーボンペーストを印刷し、絶縁層をコートした後、銀が露出している残り1本のリード先端部について、その表面を処理して塩化銀を形成し、銀/塩化銀電極とするなどがある。

親水性高分子としてはCMCの他にゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの吸水性あるいは水溶性の親水性高分子を適当な濃度の溶液にしたものを塗布、乾燥することにより、必要な膜厚の親水性高分子層を電極上に形成することができる。

さらに、酸化還元酵素としては上記実施例に示したグルコースオキシダーゼに限定されることなく、アルコールオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼなど種々の酵素を用いることができ

る。

発明の効果

以上のように、本発明のバイオセンサは、電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を形成することにより、また、さらには2組の電極系を設け、一方の電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素からなる酵素反応層を、他方の電極系上に親水性高分子層あるいは親水性高分子と失活させた酸化還元酵素からなる層をそれぞれ形成することにより、信頼性の高い応答を得ることができる。さらに、電子受容体を担持する必要がないため、簡略な構成とすることができ、安価で保存性に優れたバイオセンサを提供することができる。

4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの断面図、第2図は電極部分の斜視図、第3図および第4図はバイオセンサの応答特性図、第5図は従来のバイオセンサの分解斜視図である。

1……絶縁性の基板、2、3、3'……リード、

-9-

-327-

-10-

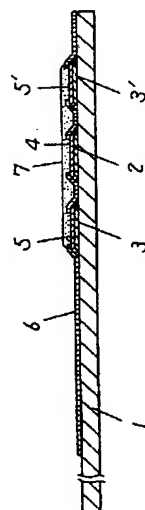
1, 9, 9' ……測定板、5, 5', 8, 8' ……対位、6 ……絶縁層、7 ……CMC-GOD層、10, 10' ……参照極、11 ……保持枠、12 ……多孔体、13 ……カバー。

代理人の氏名 井理士 中尾敏男 ほか1名

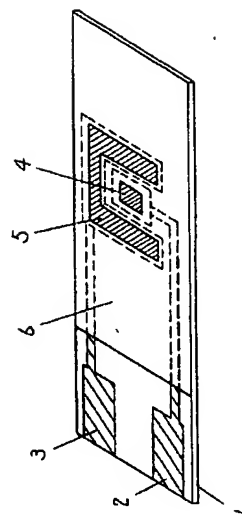
-11-

1 ……絶縁性の基板
2, 3, 3' ……リット
4 ……測定極
5, 5' ……対位
6 ……絶縁層
7 ……CMC-GOD層

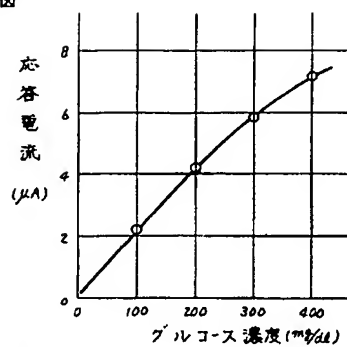
第 1 図



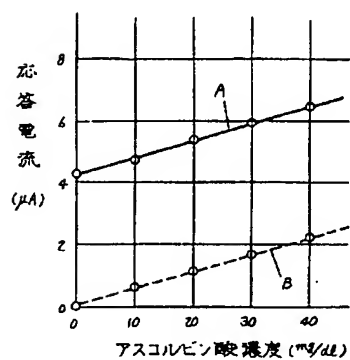
第 2 図



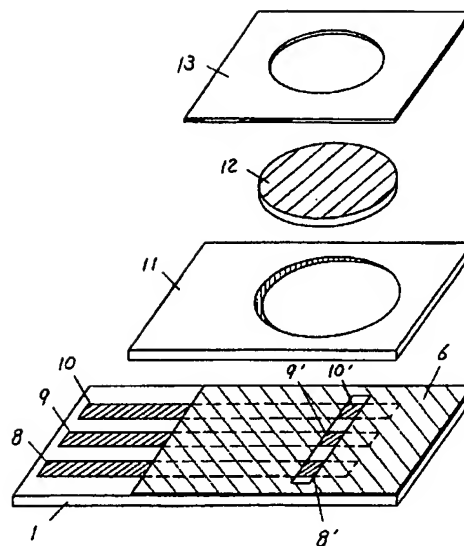
第 3 図



第 4 図



第 5 図



【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 6 部門第 1 区分
 【発行日】平成 6 年（1994）11 月 8 日

【公開番号】特開平 1-253648
 【公開日】平成 1 年（1989）10 月 9 日
 【年通号数】公開特許公報 1-2537
 【出願番号】特願昭 63-80829
 【国際特許分類第 5 版】
 G01N 27/327
 【F I】
 G01N 27/30 353 J 7363-2J

手 続 補 正 書

平成 6 年 4 月 6 日

特 許 庁 長 官 殿

1 事件の表示
 昭和 63 年 特 許 願 第 80829 号

2 発明の名称
 バイオセンサー

3 補正をする者
 事件との関係 特 許 出 願 人
 住 所 大阪府門真市大字門真 1006 番地
 名 称 (582) 松下電器産業株式会社
 代 表 者 森 下 洋 一

4 代 理 人 〒571
 住 所 大阪府門真市大字門真 1006 番地
 松下電器産業株式会社内
 氏 名 (7342) 弁護士 小 堀 浩 明
 (ほか 2 名)
 [連絡先 電話 03-3434-9471 知的財産センター]

5 補正により増加する請求項の数
 0

6 補正の対象
 明細書の発明の詳細な説明の欄

7 補正の内容

(1) 明細書第 3 ページの第 1 行目の「容を電気化学的に酸化し、」を「容体を電気化学的に酸化し、」に補正します。